

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

23.1.2004

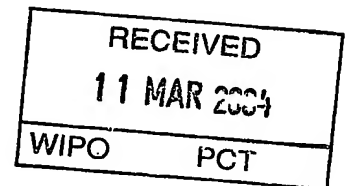
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2003年 5月12日

出願番号  
Application Number: 特願2003-133456  
[ST. 10/C]: [JP2003-133456]

出願人  
Applicant(s): 鐘淵化学工業株式会社



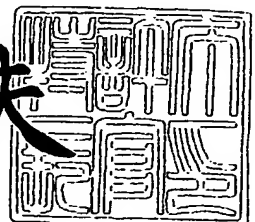
BEST AVAILABLE COPY

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 2月27日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 TKS-5029

【提出日】 平成15年 5月12日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C07C 45/72  
C12P 7/42  
C07C 69/612

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県高砂市高砂町宮前町 1 - 8 鐘淵化学工業株式会社  
高砂工業所内

【氏名】 田岡 直明

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県高砂市高砂町宮前町 1 - 8 鐘淵化学工業株式会社  
高砂工業所内

【氏名】 森山 大輔

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県高砂市高砂町宮前町 1 - 8 鐘淵化学工業株式会社  
高砂工業所内

【氏名】 森 耕平

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県高砂市高砂町宮前町 1 - 8 鐘淵化学工業株式会社  
高砂工業所内

【氏名】 大石 孝洋

【特許出願人】

【識別番号】 000000941

【氏名又は名称】 鐘淵化学工業株式会社

【代表者】 武田 正利

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 特願2002-355305

【出願日】 平成14年12月 6日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 005027

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

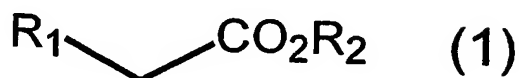
【書類名】 明細書

【発明の名称】 光学活性 3-ヒドロキシプロピオン酸エステル誘導体の製造法

【特許請求の範囲】

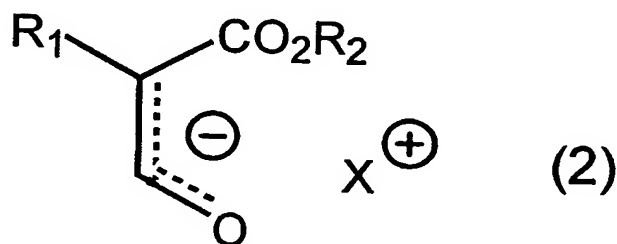
【請求項 1】 一般式 (1) ;

【化 1】



(式中、 $R_1$ は炭素数 2～10 のアルキル基、炭素数 5～15 の置換基を有しても良いアラルキル基、又は炭素数 5～15 の置換基を有しても良いアリール基を表す。 $R_2$ は炭素数 1～10 のアルキル基、又は炭素数 5～15 の置換基を有しても良いアラルキル基を表す。) で表される酢酸エステル誘導体を、塩基及び蟻酸エステルと反応させることにより、一般式 (2) ;

【化 2】



(式中、 $R_1$ 及び $R_2$ は前記と同じ。 $X$ は水素、Li、Na、またはKを表す。) で表される 2-ホルミル酢酸エステル誘導体に変換する工程、及び、生成した前記式 (2) で表される化合物を、有機溶媒と水を用い、不純物を有機層に除去しつつ前記式 (2) で表される化合物を水層に転溶する工程を含むことを特徴とする、前記式 (2) で表される 2-ホルミル酢酸エステル誘導体の製造法。

【請求項 2】 前記式 (1) 及び (2) において、 $R_1$ が炭素数 5～15 の置換基を有しても良いアラルキル基である請求項 1 記載の製造法。

【請求項 3】 前記式 (1) 及び (2) において、 $R_2$ が炭素数 1～10 のアルキル基である請求項 1 または 2 記載の製造法。

【請求項 4】 塩基が、ナトリウムハイドライド、金属ナトリウム、又はアル

カリ金属アルコキサイドである請求項 1、2 または 3 記載の製造法。

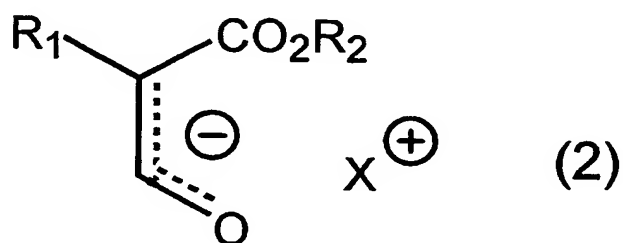
【請求項 5】 反応を、塩基を含む溶媒に酢酸エステル誘導体および蟻酸エステルを添加して行う請求項 1、2、3 または 4 記載の製造法。

【請求項 6】 反応を塩基濃度が 10 重量%以上、および反応温度が 20℃以上の条件で行う請求項 5 記載の製造法。

【請求項 7】

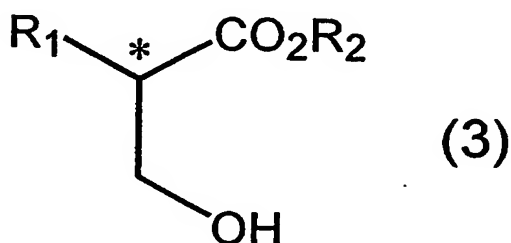
一般式 (2) ;

【化 3】



(式中、 $R_1$ は炭素数 2～10 のアルキル基、炭素数 5～15 の置換基を有しても良いアラルキル基、又は炭素数 5～15 の置換基を有しても良いアリール基を表す。 $R_2$ は炭素数 1～10 のアルキル基、又は炭素数 5～15 の置換基を有しても良いアラルキル基を表す。 $X$ は水素、Li、Na、またはKを表す。) で表される 2-ホルミル酢酸エステル誘導体に、そのホルミル基を立体選択的に還元する能力を有する酵素源を作用させることにより、一般式 (3)

【化 4】



(式中、 $R_1$ 及び $R_2$ は前記と同じ。\*は不斉炭素を表す。) で表される光学活性 3-ヒドロキシプロピオン酸エステル誘導体を製造する方法であって、ブレタノマイセス (*Brettanomyces*) 属、クリプトコッカス (*Cryptococcus*) 属、デバリオマイセス (*Debaryomyces*) 属、ガラクトマイセス (*Galactomyces*) 属

、オガタエア (*Ogataea*) 属、ピキア (*Pichia*) 属、ロドトルラ (*Rhodotorula*) 属、サッカロマイコプシス (*Saccharomycopsis*) 属、スポリディオボラス (*Sporidiobolus*) 属、スポロボロマイセス (*Sporobolomyces*) 属、ステリグマトマイセス (*Sterigmatomyces*) 属、トルラスポラ (*Torulaspora*) 属、トリコスポロン (*Trichosporon*) 属、ヤマダジーマ (*Yamadazyma*) 属、アクロモバクター (*Achromobacter*) 属、セルロモナス (*Cellulomonas*) 属、デボシア (*Devosia*) 属、ハフニア (*Hafnia*) 属、ジェンセニア (*Jensenia*) 属、クレブシエラ (*Klebsiella*) 属、マイクロコッカス (*Micrococcus*) 属、プロテウス (*Proteus*) 属、ロドコッカス (*Rhodococcus*) 属またはセラチア (*Serratia*) 属に属する微生物に由来し、前記式 (2) で表される化合物のホルミル基を R 選択的に還元する能力を有する酵素源を用いて、前記式 (3) で表される化合物の R 体を製造するか、又は、キャンディダ (*Candida*) 属、シストフィロバシディウム (*Cystofillobasidium*) 属、ピキア (*Pichia*) 属、ロドトルラ (*Rhodotorula*) 属、トルラスポラ (*Torulaspora*) 属、ウィリオプシス (*Williopsis*) 属、ヤロビア (*Yarrowia*) 属、デボシア (*Devosia*) 属、ミクロバクテリウム (*Microbacterium*) 属、又はマイクロコッカス (*Micrococcus*) 属に属する微生物に由来し、前記式 (2) で表される化合物のホルミル基を S 選択的に還元する能力を有する酵素源を用いて、前記式 (3) で表される化合物の S 体を製造することを特徴とする製造法。

【請求項 8】 前記式 (2) 及び (3) において、 $R_1$  が炭素数 5～15 の置換基を有しても良いアラルキル基である請求項 7 記載の製造法。

【請求項 9】 R 選択的な酵素源として、ブレタノマイセス・アノマラス (*Brettanomyces anomalus*)、クリプトコッカス・クルバタス (*Cryptococcus curvatus*)、クリプトコッカス・テレウス (*Cryptococcus terreus*)、デバリオマイセス・ネパレンシス (*Debaryomyces nepalensis*)、デバリオマイセス・ロベルトシエ (*Debaryomyces robertsiae*)、ガラクトマイセス・レースシイ (*Galactomyces reessii*)、オガタエア・ミヌータ バー・ミヌータ (*Ogataea minuta var. minuta*)、ピキア・カナデンシス (*Pichia canadensis*)、ピキア・シルビコラ (*Pichia silvicola*)、ピキア・キシローサ (*Pichia xylosa*)、サッカロマイコプシス・セレノスポラ (*Saccharomycopsis selenospora*)、スポリディオボ

ラス・ジョンソニー (Sporidiobolus johnsonii)、スポリディオボラス・サルモニコラ (Sporidiobolus salmonicolor)、スポロボロマイセス・サルモニコラ (Sporobolomyces salmonicolor)、ステリグマトマイセス・ハロフィラス (Stenigmatomyces halophilus)、トルラスポラ・デルブレッキイ (Torulaspora delbrueckii)、トリコスポロン・アステロイデス (Trichosporon asteroides)、ヤマダジーマ・スチピチス (Yamadazyma stipitis)、アクロモバクター・キシロキダンス サブスピーシーズ デニトリフィカンス (Achromobacter xylosoxidans subsp. denitrificans)、セルロモナス・フィミ (Cellulomonas fimi)、セルロモナス・スピーシーズ (Cellulomonas sp.)、セルロモナス・ウダ (Cellulomonas uda)、デボシア・リボフラビナ (Devosia riboflavina)、ハフニア・アルベイ (Hafnia alvei)、ジェンセニア・カニクルリア (Jensenia canicruria)、クレブシエラ・プランチコラ (Klebsiella planticola)、ミクロコッカス・ルテウス (Micrococcus luteus)、プロテウス・インコンスタンス (Proteus inconstans)、ロドコッカス・エリスロポリス (Rhodococcus erythropolis)、ロドコッカス・エクイ (Rhodococcus equi)、ロドコッカス・エスピー (Rhodococcus sp.)、及びセラチア・マルセッセンス (Serratia marcescens) からなる群より選択される微生物由来の酵素源を用い、前記式(3)で表される化合物のR体を製造する請求項7記載の製造法。

【請求項10】 R選択的な酵素源が、Escherichia coli HB101(pNTDRG1) (FERM P-18872)、Escherichia coli HB101(pNTSGG1) (FERM P-18449)、Escherichia coli HB101(pTSBG1) (FERM BP-7119) 又はEscherichia coli HB101(pNTRS) (FERM P-18711) の培養物又はその処理物である請求項7または9記載の製造法。

【請求項11】 S選択的な酵素源として、キャンディダ・マグノリエ (Candida magnoliae)、シストフィロバシディウム・ビスポリダイ (Cystofillobasidium bisporidii)、ピキア・ビスポーラ (Pichia bispola)、ロドトルラ・グルチニス バー。 グルチニス (Rhodotorula glutinis var. glutinis)、トルラスポラ・グロボーサ (Torulaspora globosa)、ウィリオプシス・サツルヌス バー。 マラキイ (Williopsis saturnus var. mrakii)、ウィリオプシス・サ

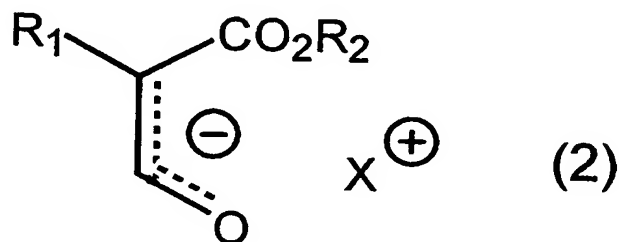
ツルヌス バー. サツルヌス (*Williopsis saturnus* var. *saturnus*)、ヤロ  
 ビア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*)、デボシア・リボフラビナ (*Devos  
 ia riboflavina*)、ミクロバクテリウム・エステラロマチカム (*Microbacterium  
 esteraromaticum*)、及びミクロコッカス・ルテウス (*Micrococcus luteus*) か  
 らなる群より選択される微生物由来の酵素源を用い、前記式 (3) で表される化  
 合物の S 体を製造する請求項 7 記載の製造法。

【請求項 12】 S 選択的な酵素源が、*Escherichia coli* HB101(pNTCRG) (FE  
 RM BP-6898)、*Escherichia coli* HB101(pNTDRG1) (FERM P-18872)、又は *Esche  
 richia coli* HB101(pTSBG1) (FERM BP-7119) の培養物又はその処理物である請  
 求項 7 または 11 記載の製造方法。

【請求項 13】

一般式 (2) ;

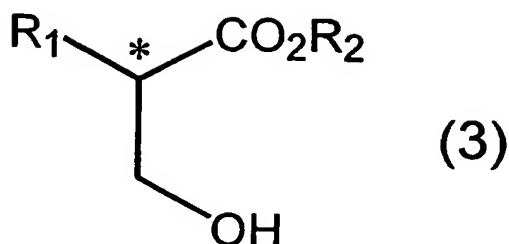
【化 5】



(式中、R<sub>1</sub>は炭素数2～10のアルキル基、炭素数5～15の置換基を有して  
 も良いアラルキル基、又は炭素数5～15の置換基を有しても良いアリール基を  
 表す。R<sub>2</sub>は炭素数1～10のアルキル基、又は炭素数5～15の置換基を有し  
 ても良いアラルキル基を表す。Xは水素、Li、Na、又はKを表す。) で表さ  
 れる2-ホルミル酢酸エステル誘導体に、そのホルミル基を立体選択的に還元す  
 る能力を有する酵素源を作用させることにより、一般式 (3)



【化6】



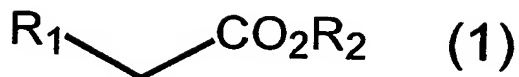
(式中、 $\text{R}_1$ 及び $\text{R}_2$ は前記と同じ。 $*$ は不斉炭素を表す。)で表される光学活性 3-ヒドロキシプロピオン酸エステル誘導体を製造する方法であって、カンディダ・カンタレリ (*Candida cantarellii*)、カンディダ・グラエボーサ (*Candida glabrosa*)、カンディダ・グロベンギッセリイ (*Candida gropengiesseri*)、カンディダ・ラクチス・コンデンシイ (*Candida lactis-condensi*)、カンディダ・マグノリエ (*Candida magnoriae*)、カンディダ・マルトーサ (*Candida maltosa*)、カンディダ・マリス (*Candida maris*)、カンディダ・モギイ (*Candida mogii*)、カンディダ・ピニ (*Candida pini*)、カンディダ・ルゴーサ (*Candida rugosa*)、カンディダ・ソルボフィラ (*Candida sorbophila*)、カンディダ・トロピカリス (*Candida tropicalis*)、カンディダ・バーサチリス (*Candida versatilis*)、ロドトルラ・アウランチアカ (*Rhodotorula aurantiaca*)、ロドトルラ・グラミニス (*Rhodotorula graminis*)、及びロドトルラ・ラクトーサ (*Rhodotorula lactosa*) からなる群より選択される微生物由来の酵素源を用い、前記式 (3) で表される化合物の R 体を製造することを特徴とする製造法。

【請求項 14】 酵素源が、*Escherichia coli* HB101(pNTRCG) (FERM BP-6898)、*Escherichia coli* HB101(pNTRGG1) (FERM BP-7858) の培養物又はその処理物である請求項 13 記載の製造法。

【請求項 15】 前記式 (2) 及び (3) において、 $\text{R}_1$ が 3, 4-メチレンジオキシベンジル基である請求項 13 記載の製造法。

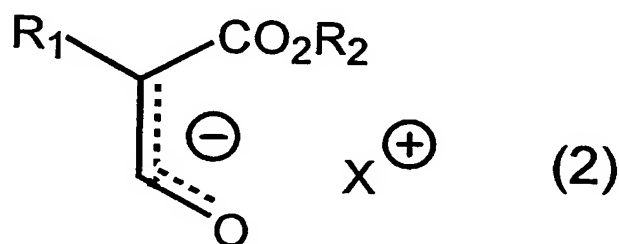
【請求項 16】 一般式 (1) ;

【化7】



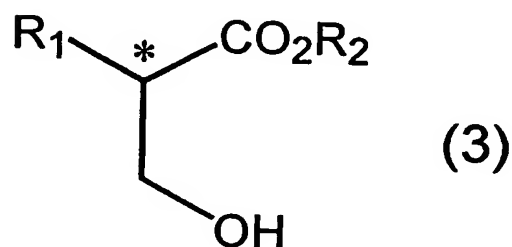
(式中、 $R_1$ は炭素数2～10のアルキル基、炭素数5～15の置換基を有しても良いアラルキル基、又は炭素数5～15の置換基を有しても良いアリール基を表す。 $R_2$ は炭素数1～10の置換基を有しても良いアルキル基、又は炭素数5～15の置換基を有しても良いアラルキル基を表す。)、で表される酢酸エステル誘導体を、塩基及び蟻酸エステルと反応させることにより、一般式(2)；

【化8】



(式中、 $R_1$ 及び $R_2$ は前記と同じ。 $X$ は水素、Li、Na、又はKを表す。)、で表される2-ホルミル酢酸エステル誘導体に変換する工程、生成した前記式(2)で表される化合物を、有機溶媒と水を用い、不純物を有機層に除去しつつ前記式(2)で表される化合物を水層に転溶する工程、及び前記式(2)で表される化合物のホルミル基を立体選択的に還元する能力を有する酵素源を用いて、前記式(2)で表される化合物を立体選択的に還元することにより、一般式(3)；

【化9】



(式中、 $R_1$ 及び $R_2$ は前記と同じ。 $*$ は不斉炭素を表す。)で表される光学活性

3-ヒドロキシプロピオン酸エステル誘導体を取得する工程を含むことを特徴とする、前記式(3)で表される光学活性3-ヒドロキシプロピオン酸エステル誘導体の製造法。

【請求項17】 前記式(2)及び(3)において、 $R_1$ が炭素数5～15の置換基を有しても良いアラルキル基である請求項16記載の製造法。

【請求項18】 前記式(2)及び(3)において、 $R_2$ が炭素数1～10のアルキル基である請求項16または17記載の製造法。

【請求項19】 前記式(2)で表される化合物のホルミル基を立体選択的に還元する能力を有する酵素源が、ブレタノマイセス (*Brettanomyces*) 属、キャンディダ (*Candida*) 属、クリプトコッカス (*Cryptococcus*) 属、デバリオマイセス (*Debaryomyces*) 属、ガラクトマイセス (*Galactomyces*) 属、オガタエア (*Ogataea*) 属、ピキア (*Pichia*) 属、ロドトルラ (*Rhodotorula*) 属、サッカロマイコプシス (*Saccharomycopsis*) 属、スポリディオボラス (*Sporidiobolus*) 属、スポロボロマイセス (*Sporobolomyces*) 属、ステリグマトマイセス (*Sterigmatomyces*) 属、トルラスポラ (*Torulaspora*) 属、トリコスポロン (*Trichosporon*) 属、ヤマダジーマ (*Yamadazyma*) 属、アクロモバクター (*Achromobacter*) 属、セルロモナス (*Cellulomonas*) 属、デボシア (*Devosia*) 属、ハフニア (*Hafnia*) 属、ジェンセニア (*Jensenia*) 属、クレブシエラ (*Klebsiella*) 属、プロテウス (*Proteus*) 属、ロドコッカス (*Rhodococcus*) 属、セラチア (*Serratia*) 属、シストフィロバシディウム (*Cystofillobasidium*) 属、ウィリオプシス (*Williopsis*) 属、ヤロビア (*Yarrowia*) 属、ミクロバクテリウム (*Microbacterium*) 属、又はミクロコッカス (*Micrococcus*) 属に属する微生物に由来する酵素源である請求項16記載の製造法。

【請求項20】 酵素源として、ブレタノマイセス (*Brettanomyces*) 属、キャンディダ (*Candida*) 属、クリプトコッカス (*Cryptococcus*) 属、デバリオマイセス (*Debaryomyces*) 属、ガラクトマイセス (*Galactomyces*) 属、オガタエア (*Ogataea*) 属、ピキア (*Pichia*) 属、ロドトルラ (*Rhodotorula*) 属、サッカロマイコプシス (*Saccharomycopsis*) 属、スポリディオボラス (*Sporidiobolus*) 属、スポロボロマイセス (*Sporobolomyces*) 属、ステリグマトマイセス (*Sterig*

matomyces) 属、トルラスポラ (Torulaspora) 属、トリコスポロン (Trichosporon) 属、ヤマダジーマ (Yamadazyma) 属、アクロモバクター (Achromobacter) 属、セルロモナス (Cellulomonas) 属、デボシア (Devosia) 属、ハフニア (Hafnia) 属、ジェンセニア (Jensenia) 属、クレブシエラ (Klebsiella) 属、マイクロコッカス (Micrococcus) 属、プロテウス (Proteus) 属、ロドコッカス (Rhodococcus) 属、又はセラチア (Serratia) 属に属する微生物に由来し、前記式 (2) で表される化合物のホルミル基を R 選択的に還元する能力を有する酵素源を用い、前記式 (3) で表される化合物の R 体を製造する請求項 19 記載の製造法。

【請求項 21】 R 選択的に還元する能力を有する酵素源が、ブレタノマイセス・アノマラス (Brettanomyces anomalus)、キャンディダ・カンタレリ (Candida cantarellii)、キャンディダ・グラエボーサ (Candida glabrosa)、キャンディダ・グロペンギッセリイ (Candida gropengiesseri)、キャンディダ・ラクチス-コンデンシイ (Candida lactis-condensi)、キャンディダ・マグノリエ (Candida magnoriae)、キャンディダ・マルトーサ (Candida maltosa)、キャンディダ・マリス (Candida maris)、キャンディダ・モギイ (Candida mogii)、キャンディダ・ピニ (Candida pini)、キャンディダ・ルゴース (Candida rugosa)、キャンディダ・ソルボフィラ (Candida sorbophila)、キャンディダ・トロピカリス (Candida tropicalis)、キャンディダ・バーサチリス (Candida versatilis)、クリプトコッカス・クルバタス (Cryptococcus curvatus)、クリプトコッカス・テレウス (Cryptococcus terreus)、デバリオマイセス・ネパレンシス (Debaryomyces nepalensis)、デバリオマイセス・ロベルトシエ (Debaryomyces robertsiae)、ガラクトマイセス・レースシイ (Galactomyces reessii)、オガタエア・ミヌータ バー. ミヌータ (Ogataea minuta var. minuta)、ピキア・カナデンシス (Pichia canadensis)、ピキア・シルビコラ (Pichia silvicola)、ピキア・キシローサ (Pichia xylosa)、ロドトルラ・アウランチアカ (Rhodotorula aurantiaca)、ロドトルラ・グラミニス (Rhodotorula graminis)、ロドトルラ・ラクトーサ (Rhodotorula lactosa)、サッカロマイコプシス・セレノスポラ (Saccharomycopsis selenospora)、スポリディオボラス

・ジョンソニイ (Sporidiobolus johnsonii)、スポリディオボラス・サルモニコラ (Sporidiobolus salmonicolor)、スポロボロマイセス・サルモニコラ (Sporobolomyces salmonicolor)、ステリグマトマイセス・ハロフィラス (Sterigmatomyces halophilus)、トルラスポラ・デルブレッキイ (Torulaspora delbrueckii)、トリコスポロン・アステロイデス (Trichosporon asteroides)、ヤマダジーマ・スチピチス (Yamadazyma stipitis)、アクロモバクター・キシロキダンス サブスピーシーズ デニトリフィカンズ (Achromobacter xylosoxidans subsp. denitrificans)、セルロモナス・フィミ (Cellulomonas fimi)、セルロモナス・スピーシーズ (Cellulomonas sp.)、セルロモナス・ウダ (Cellulomonas uda)、デボシア・リボフラビナ (Devosia riboflavina)、ハフニア・アルベイ (Hafnia alvei)、ジェンセニア・カニクルリア (Lensenia canicruria)、クレブシエラ・プランチコラ (Klebsiella planticola)、ミクロコッカス・ルテウス (Micrococcus luteus)、プロテウス・インコンスタンス (Proteus inconstans)、ロドコッカス・エリスロポリス (Rhodococcus erythropolis)、ロドコッカス・エクイ (Rhodococcus equi)、ロドコッカス・エスピー (Rhodococcus sp.)、及びセラチア・マルセッセンス (Serratia marcescens) からなる群より選択される微生物由来の酵素源である請求項 20 記載の製造法。

【請求項 22】 R 選択的に還元する能力を有する酵素源が、Escherichia coli HB101(pNTCRG) (FERM BP-6898)、Escherichia coli HB101(pNTDRG1) (FERM P-18872)、Escherichia coli HB101(pNTRGG1) (FERM BP-7858)、Escherichia coli HB101(pNTSGG1) (FERM P-18449)、Escherichia coli HB101(pTSBG1) (FERM BP-7119)、又はEscherichia coli HB101(pNTRS) (FERM P-18711) の培養物又はその処理物である請求項 21 記載の製造法。

【請求項 23】 酵素源として、キャンディダ (Candida) 属、シストフィロバシディウム (Cystofillobasidium) 属、ピキア (Pichia) 属、ロドトルラ (Rhodotorula) 属、トルラスポラ (Torulaspora) 属、ウィリオプシス (Williopsis) 属、ヤロビア (Yarrowia) 属、デボシア (Devosia) 属、ミクロバクテリウム (Microbacterium) 属、又はミクロコッカス (Micrococcus) 属に属する微生物に由来し、前記式 (2) で表される化合物のホルミル基を S 選択的に還元する能

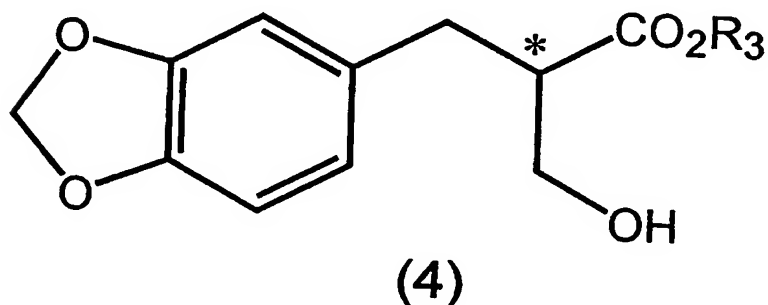
力を有する酵素源を用い、前記式(3)で表される化合物のS体を製造する請求項19記載の製造法。

【請求項24】 前記式(2)で表される化合物のホルミル基をS選択的に還元する能力を有する酵素源が、キャンディダ・マグノリエ (*Candida magnoliae*)、シストフィロバシディウム・ビスポリディ (*Cystofillobasidium bisporidi*)、ピキア・ビスポーラ (*Pichia bispola*)、ロドトルラ・グルチニス バー・グルチニス (*Rhodotorula glutinis* var. *glutinis*)、トルラスポラ・グロポーサ (*Torulaspora globosa*)、ウィリオプシス・サツルヌス バー・マラキイ (*Williopsis saturnus* var. *mrakii*)、ウィリオプシス・サツルヌス バー・サツルヌス (*Williopsis saturnus* var. *saturnus*)、ヤロビア・リポリティカ (*Yarrowia lipolytica*)、デボシア・リボフラビナ (*Devosia riboflavina*)、ミクロバクテリウム・エステラロマチカム (*Microbacterium esteraromaticum*)、及びミクロコッカス・ルテウス (*Micrococcus luteus*) からなる群より選択される微生物由来の酵素源である請求項23記載の製造方法。

【請求項25】 前記式(2)で表される化合物のホルミル基をS選択的に還元する能力を有する酵素源が、*Escherichia coli* HB101(pNTCRG) (FERM BP-6898)、*Escherichia coli* HB101(pNTDRG1) (FERM P-18872)、又は*Escherichia coli* HB101(pTSBG1) (FERM BP-7119) の培養物またはその処理物である請求項23または24記載の製造法。

【請求項26】 一般式(4)；

【化10】

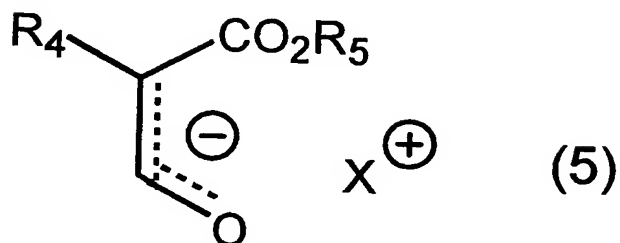


(式中、R<sub>3</sub>は炭素数1～10のアルキル基を表す。)、で表される光学活性2-(ヒドロキシメチル)-3-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-プロピ

オン酸エステル誘導体。

【請求項 27】 一般式 (5) ;

【化 11】



(式中、 $\text{R}_4$ は炭素数2～6のアルキル基を表す。 $\text{R}_5$ は炭素数1～10のアルキル基を表す。 $\text{X}$ は水素、 $\text{Li}$ 、 $\text{Na}$ 、又は $\text{K}$ を表す。)、で表される2-ホルミル酢酸エステル誘導体。

【請求項 28】 一般式 (5) において、 $\text{R}_5$ がエチル基である請求項 27 記載の2-ホルミル酢酸エステル誘導体。

【請求項 29】 一般式 (5) において、 $\text{R}_4$ がエチル基、プロピル基、ブチル基、ペンチル基、又はヘキシル基である請求項 27 または 29 記載の2-ホルミル酢酸エステル誘導体。

## 【発明の詳細な説明】

### 【0001】

### 【発明の属する技術分野】

本発明は、医薬品中間体として有用な光学活性3-ヒドロキシプロピオン酸エステル誘導体、とりわけ光学活性2-(ヒドロキシメチル)-3-フェニルプロピオン酸エステル誘導体の製法に関する。より詳細には、安価に入手可能な酢酸エステル誘導体、蟻酸エステル及び塩基を用いて2-ホルミル酢酸エステル誘導体を合成し、当該2-ホルミル酢酸エステル誘導体を、そのホルミル基を立体選択的に還元する能力を有する酵素源を用いて立体選択的に還元することを特徴とする、光学活性3-ヒドロキシプロピオン酸エステル誘導体、とりわけ光学活性2-(ヒドロキシメチル)-3-フェニルプロピオン酸エステル誘導体の製法の

製法に関する。

#### 【0002】

##### 【従来の技術】

従来、光学活性 3-ヒドロキシプロピオン酸エステル誘導体の製造法としては、以下の様な方法が知られている。

- 1) 2-置換-1, 3-プロパンジオールを微生物を用いて不斉酸化することにより、光学活性 2-置換-3-ヒドロキシプロピオン酸を得る方法（非特許文献 1）。
- 2) 0.1%濃度の 2-ホルミル酢酸エステル誘導体をキャンディダ属、ロドトルラ属、トルロプシス属等に属する微生物を用いて還元することにより、光学活性 3-ヒドロキシプロピオン酸エステル誘導体を得る方法（特許文献 1）。

#### 【0003】

しかしながら、1)の方法では、基質として用いるジオール化合物が高価であり、また、2位置換基がメチル基以外の場合では立体選択性も低い、また、2)の方法では、使用基質が微生物、酵素の還元活性に悪影響を与えることから、仕込濃度が極めて低い等、いずれも工業的製法としては大きな課題を有している。

#### 【0004】

一方、2-ホルミル酢酸エステル誘導体の製造法としては、以下の様な方法が知られている。

- 3) 2-メチル-1, 3-ジオキソラン-2-プロピオン酸エチルを NaH 及び蟻酸エチルを用いてホルミル化した後、蒸留精製することにより、 $\alpha$ -(ホルミル)-2-メチル-1, 3-ジオキソラン-2-プロピオン酸エチルを得る方法（非特許文献 2）。
- 4) フェニルプロピオン酸エチルを金属ナトリウム及び蟻酸エチルを用いてホルミル化することにより、粗 2-ホルミルフェニルプロピオン酸エチルを得る方法（非特許文献 3）。

#### 【0005】

しかしながら、いずれの方法においても反応生成物は未反応原料あるいは NaH 由来の鉱油等の不純物を多く含有しており、高純度の生成物を得るには、蒸留



、晶析またはカラム等の精製工程を必要とする等、工業的製法としては改善すべき課題を有している。

【0006】

【特許文献1】

特開昭60-199389

【0007】

【非特許文献1】

Chem. Lett., 1979, Vol. 11, 1379-80

【0008】

【非特許文献2】

Phosphorus and Sulfur, 1986, Vol. 28, 345-330

【0009】

【非特許文献3】

Eur. J. Med. Chem., 1988, Vol. 23, 53-62

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

上記に鑑み、本発明の目的は、医薬品の中間体として有用な光学活性3-ヒドロキシプロピオン酸エステル誘導体、中でも光学活性2-（ヒドロキシメチル）-3-フェニルプロピオン酸エステル誘導体を安価で入手容易な原料から簡便に製造する方法を提供することにある。

【0011】

【課題を解決するための手段】

本発明者等は上記課題につき鋭意検討を行った結果、安価に入手可能な酢酸エステル誘導体から、簡便な方法にて高純度の2-ホルミル酢酸エステル誘導体を合成し、該2-ホルミル酢酸エステル誘導体を、そのホルミル基を立体選択的に還元する能力を有する酵素源を用いて立体選択的に還元することにより、光学活性3-ヒドロキシプロピオン酸エステル誘導体を簡便に製造する方法を見出し、

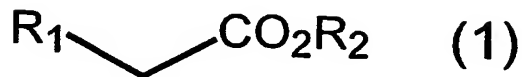
本発明を完成するに至った。

【0012】

即ち、本発明は、一般式 (1) ;

【0013】

【化12】

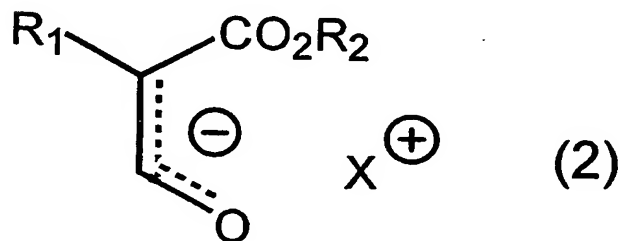


【0014】

(式中、 $R_1$ は炭素数2～10のアルキル基、炭素数5～15の置換基を有しても良いアラルキル基、又は炭素数5～15の置換基を有しても良いアリール基を表し、 $R_2$ は炭素数1～10のアルキル基、炭素数5～15の置換基を有しても良いアラルキル基を表す。) で表される酢酸エステル誘導体を、塩基及び蟻酸エステルと反応させることにより、一般式 (2) ;

【0015】

【化13】



【0016】

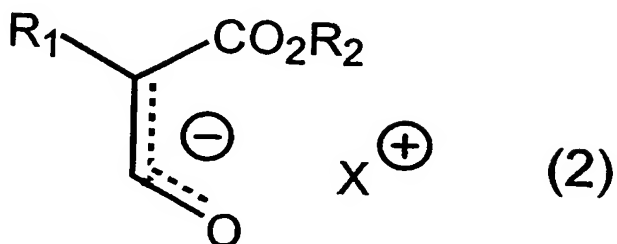
(式中、 $R_1$ 及び $R_2$ は前記と同じ、 $X$ は水素、Li、Na、又はKを表す。) で表される2-ホルミル酢酸エステル誘導体に変換する工程、及び、生成した前記式 (2) で表される化合物を、有機溶媒と水溶媒を用いて、不純物を有機層に除去しつつ前記式 (2) で表される化合物を水層に転溶する工程からなることを特徴とする、前記式 (2) で表される2-ホルミル酢酸エステル誘導体の製造法を提供する。

【0017】

また、本発明は一般式 (2) ;

【0018】

【化14】

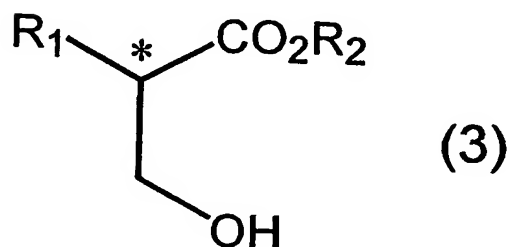


【0019】

(式中、 $\text{R}_1$ 、 $\text{R}_2$ 及び $\text{X}$ は前記と同じ基を表す。) で表される 2-ホルミル酢酸エステル誘導体を、そのホルミル基を立体選択的に還元する能力を有する酵素源を用いて立体選択的に還元することを特徴とする、一般式 (3) ;

【0020】

【化15】



【0021】

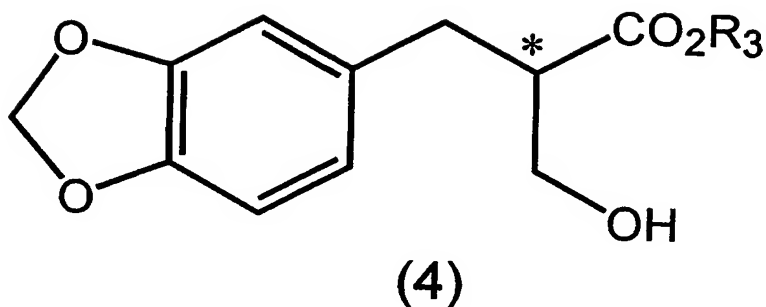
(式中、 $\text{R}_1$ 及び $\text{R}_2$ は前記と同じ、\*は不斉炭素を表す。) で表される光学活性 3-ヒドロキシプロピオン酸エステル誘導体の製造法を提供する。

【0022】

また、本発明は一般式 (4)

【0023】

【化16】



【0024】

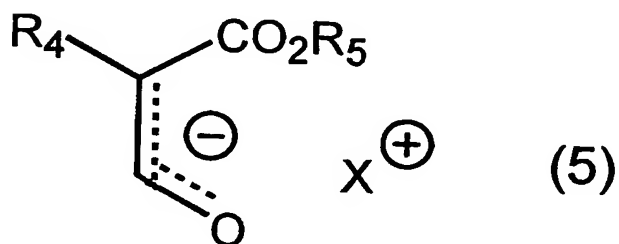
(式中、 $R_3$ は炭素数1～10の低級アルキル基を表し、\*は不斉炭素を表す。) で表される光学活性2-(ヒドロキシメチル)-3-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-プロピオン酸エステル誘導体を提供する。

【0025】

また、本発明は一般式(5)

【0026】

【化17】



【0027】

(式中、 $R_4$ は炭素数2～6の低級アルキル基を表す。 $R_5$ は炭素数1～10の低級アルキル基を表す。 $X$ は水素、Li、Na、又はKを表す。) で表される2-ホルミル酢酸エステル誘導体を提供する。

【0028】

以下に本発明を詳細に説明する。

【0029】

まず、本発明に関わる化合物について説明する。前記式(1)、(2)及び(3)において、 $R_1$ としては、炭素数2～10のアルキル基、炭素数5～15の

置換基を有しても良いアラルキル基、又は炭素数 5～15 の置換基を有しても良いアリール基が挙げられる。

### 【0030】

例えば、炭素数 2～10 のアルキル基としては、エチル基、*n*-プロピル基、*i*s*o*-プロピル基、*n*-ブチル基、*sec*-ブチル基、*tert*-ブチル基、*n*-ペンチル基、又はヘキシル基等が挙げられる。炭素数 5～15 の置換基を有しても良いアラルキル基としては、ベンジル基、*o*-クロロベンジル基、*m*-ブromoベンジル基、*p*-フルオロベンジル基、*p*-ニトロベンジル基、*p*-シアノベンジル基、*m*-メトキシベンジル基、3, 4-メチレンジオキシベンジル基、フェネチル基、ナフチルメチル基、又はピリジルメチル基等が挙げられる。炭素数 5～15 の置換基を有しても良いアリール基としては、フェニル基、*o*-クロロフェニル基、*m*-ブromoフェニル基、*p*-フルオロフェニル基、*p*-ニトロフェニル基、*p*-シアノフェニル基、*m*-メトキシフェニル基、ナフチル基、ピリジル基、又はインドリル基等が挙げられる。上記のなかでも  $R_1$  として好ましくは、ベンジル基、又は 3, 4-メチレンジオキシベンジル基であり、より好ましくは 3, 4-メチレンジオキシベンジル基である。

### 【0031】

また、 $R_2$  としては、炭素数 1～10 のアルキル基、または炭素数 5～15 の置換基を有しても良いアラルキル基が挙げられる。例えば、炭素数 1～10 のアルキル基としては、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、*i*s*o*-プロピル基、*n*-ブチル基、*sec*-ブチル基、又は *tert*-ブチル基等が挙げられる。炭素数 5～15 の置換基を有しても良いアラルキル基としては、ベンジル、*o*-クロロベンジル基、*m*-ブromoベンジル基、*p*-フルオロベンジル基、*p*-ニトロベンジル基、*p*-シアノベンジル基、又は *m*-メトキシベンジル基等が挙げられる。上記のなかでも  $R_2$  として好ましくは、メチル基、エチル基、*tert*-ブチル基、又はベンジル基である。

### 【0032】

上記の  $R_1$  及び  $R_2$  を有する化合物 (1) は、工業的に入手可能、あるいは工業的に入手可能な原料から容易に合成することができる。例えば、3-(3, 4-

メチレンジオキシフェニル) - プロピオン酸エチルは、3, 4-メチレンジオキシ桂皮酸を水素化した後、エチルエステル化することにより容易に調製することができる。

#### 【0033】

また、前記式(4)において、 $R_3$ は炭素数1~10のアルキル基、例えば、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、*i*s*o*-プロピル基、*n*-ブチル基、*sec*-ブチル基、又は*tert*-ブチル基を表す。また、前記式(3)及び(4)において、\*は不斉炭素を表す。

#### 【0034】

また、前記式(5)において、 $R_4$ は炭素数2~6のアルキル基、例えば、エチル基、*n*-プロピル基、*i*s*o*-プロピル基、*n*-ブチル基、*sec*-ブチル基、*tert*-ブチル基、ペンチル基、又はヘキシル基を表す。 $R_5$ は炭素数1~10のアルキル基、例えば、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、*i*s*o*-プロピル基、*n*-ブチル基、*sec*-ブチル基、又は*tert*-ブチル基を表す。

#### 【0035】

なお、前記式(4)で表される光学活性2-(ヒドロキシメチル)-3-(3, 4-メチレンジオキシフェニル)-プロピオン酸エステル誘導体及び前記式(5)で表される2-ホルミル酢酸エステル誘導体は文献に未記載の新規化合物である。

#### 【0036】

次に本発明における前記式(2)で表される2-ホルミル酢酸エステル誘導体の製造法について説明する。

#### 【0037】

前記式(1)で表される酢酸エステル誘導体を、適当な溶媒中にて塩基及び蟻酸エステルと反応させることにより、前記式(2)で表される2-ホルミル酢酸エステル誘導体を製造することができる。

#### 【0038】

上記塩基としては、ナトリウムハイドライド(NaH)、金属ナトリウム(N

a)、ナトリウムメトキサイド (MeONa)、ナトリウムエトキサイド (EtONa)、ナトリウムイソプロポキサイド (iPrONa)、又はカリウム tert-ブトキサイド (tBuOK) 等のアルカリ金属アルコキサイド等が挙げられ、好ましくは、ナトリウムハイドライド (NaH) が挙げられる。塩基の使用量は、酢酸エステル誘導体と塩基のモル比として、1:1~1:15、好ましくは 1:1~1:5、より好ましくは 1:1~1:3 である。

#### 【0039】

上記蟻酸エステルとしては、例えば、蟻酸メチル、蟻酸エチル、蟻酸 n-プロピル、蟻酸 iso-プロピル、蟻酸 n-ブチル、蟻酸 iso-ブチル、又は蟻酸 tert-ブチル酸が挙げられ、好ましくは、蟻酸メチル、又は蟻酸エチルである。なお、本反応においては、塩基性条件下、蟻酸エステル由来のアルコールが副生する為、前記酢酸エステル誘導体は副生したアルコールによりエステル交換され易い。そこで、前記酢酸エステル誘導体と蟻酸エステルのエステル基は同一基であることが望ましい。蟻酸エステルの使用量は、酢酸エステル誘導体と蟻酸エステルのモル比として 1:1~1:30、好ましくは 1:1~1:10、より好ましくは 1:1~1:5 である。

#### 【0040】

本反応に使用できる溶媒としては、例えば、ヘキサン、ヘプタン、ベンゼン、トルエン等の炭化水素系溶剤；ジエチルエーテル、テトラヒドロフラン、1,4-ジオキサン、tert-ブチルメチルエーテル、ジメトキシエタン等のエーテル系溶剤；塩化メチレン、クロロホルム、1,1,1-トリクロロエタン等のハロゲン系溶剤；ジメチルホルムアミド、アセトアミド、ホルムアミド、アセトニトリル、プロピオニトリル等の含窒素系溶剤；ジメチルスルホキシド、N-メチルピロリドン、ヘキサメチルリン酸トリアミド等の非プロトン性極性溶剤；メタノール、エタノール、n-プロパノール、n-ブタノール等のアルコール系溶剤が挙げられる。上記溶媒は単独で用いてもよく、2種以上を併用してもよい。

#### 【0041】

本反応の反応温度としては、好ましくは -20~60℃、より好ましくは 0~50℃ である。本反応の反応時間としては、好ましくは 1時間~72時間、より

好ましくは1時間～20時間である。

#### 【0042】

上記反応を行うに際し、各試剤の混合方法は特に限定されないが、工業的規模で反応を安全に制御して行う上では、塩基と溶剤の混合物に、酢酸エステル誘導体および蟻酸エステルを同時に添加する方法が好ましい。この方法では、加えた酢酸エステル誘導体が逐次反応するため、添加速度を調節することによって反応を安全に制御することができる。ここで、工業的規模とは、反応で用いる塩基使用量として、通常1kg以上であり、好ましくは10kg以上、より好ましくは100kg以上、さらに好ましくは1000kg以上であり、とりわけ10000kg以上の塩基を反応に供することを意味する。

#### 【0043】

酢酸エステル誘導体および蟻酸エステルの添加時間は、反応の規模にもよるが、1時間以上とすることが好ましく、より好ましくは3時間以上、さらに好ましくは5時間以上である。また、この方法にて反応をより安全に行う上では、塩基濃度を高めることが好ましく、その際の塩基濃度としては一概には云えないが、通常10重量%以上、好ましくは20重量%以上、より好ましくは30重量%以上であり、とりわけ40重量%以上として反応を行うことも好適である。

#### 【0044】

更には、上記反応方法に於いては、反応温度を高めて、添加した基質をより短時間で反応させて、反応を安全に制御することが好ましい。この場合の反応温度としては一概には云えないが、通常、20℃以上であり、好ましくは30℃以上、より好ましくは40℃以上であり、また反応液の沸点まで反応温度を高めてもよい。

#### 【0045】

尚、反応の進行と共に反応液の流動性が低下する場合には、適正な攪拌状態を維持して反応を円滑に行う上で、反応の進行に応じて溶媒を添加すれば良く、簡便には酢酸エステル誘導体と蟻酸エステルの混合物を溶媒に溶解した溶液として加えれば良い。

#### 【0046】



反応終了後、反応液中に含まれる前記式(2)で表される2-ホルミル酢酸エステル誘導体は、その製造過程における各種分解や副反応、また原料等が残存することにより多量の不純物、例えば、未反応酢酸エステル誘導体、蟻酸エステル、鉱油等の塩基由来の不純物等を多数含む。高純度の目的物を得るためには、これらの不純物を除去する必要がある。本発明者らは鋭意検討の結果、2-ホルミル酢酸エステル誘導体及び不純物を含有する反応液を水と接触させることで、2-ホルミル酢酸エステル誘導体のアルカリ金属塩を水層に、不純物を有機層に選択的に分配できることを見いだし、得られた水層を酸を用いて酸性化した後、有機溶媒で抽出、濃縮することにより、これら不純物を簡便に除去し、高純度の目的物を効率よく取得できる方法を開発するに至った。

#### 【0047】

以下に、単離精製操作について説明する。前記式(2)で表される2-ホルミル酢酸エステル誘導体に含まれる不純物を除去する為には、2-ホルミル酢酸エステル誘導体及び不純物を含有する反応液に水を添加して、2-ホルミル酢酸エステル誘導体のアルカリ金属塩を水層に選択的に転溶することが好ましい。この場合、目的物である2-ホルミル酢酸エステル誘導体をほとんどロスすることなく、未反応酢酸エステル誘導体等の不純物を反応溶媒等の有機層に除去することができる。

#### 【0048】

一方、上記転溶操作なしに、反応液に酸を加えて抽出する場合、目的物である2-ホルミル酢酸エステル誘導体及び未反応酢酸エステル誘導体等の不純物とともに反応溶媒等の有機層に抽出される為、高純度の目的物を得ることができない。

#### 【0049】

水の添加に先立ち、予め反応液を濃縮減量しても良く、また、反応液に一般的な抽出溶媒、例えば、酢酸エチル、トルエン、ヘキサン、メチルエチルケトン、tertブチルメチルエーテル、ジエチルエーテル、塩化メチレン等を添加しておいても良い。また、2-ホルミル酢酸エステル誘導体のアルカリ金属塩を水層に転溶した後、水層を上記一般的な抽出溶媒を用いて再洗浄することにより、不

純物をさらに低減することも可能である。

#### 【0050】

上記の高純度の2-ホルミル酢酸エステル誘導体を含む水層を、一般的な酸、例えば、塩酸、硫酸等の無機酸、酢酸、クエン酸等の有機酸等を用いて、pH 5以下、好ましくはpH 3以下に調整した後、上記一般的な抽出溶媒を用いて抽出した後、濃縮することにより化学純度の高い目的物を効率よく取得することができる。

#### 【0051】

次に、本発明における光学活性3-ヒドロキシプロピオン酸エステル誘導体の製造法について説明する。

#### 【0052】

前記式(2)で表される2-ホルミル酢酸エステル誘導体のホルミル基を立体選択的に還元する活性を有する酵素源の存在下、前記式(2)のホルミル基を立体選択的に還元することにより、前記式(3)で表される光学活性3-ヒドロキシプロピオン酸エステル誘導体を製造することができる。

#### 【0053】

ここで、「酵素源」とは、上記還元活性を有する酵素自体はもちろんのこと、上記還元活性を有する微生物の培養物およびその処理物も含まれる。「微生物の培養物」とは、菌体を含む培養液あるいは培養菌体を意味し、「その処理物」とは、例えば、粗抽出液、凍結乾燥微生物体、アセトン乾燥微生物体、またはそれら菌体の磨砕物等を意味する。さらにそれらは、酵素自体あるいは菌体のまま公知の手段で固定化されて用いることができる。固定化は、当業者に周知の方法（例えば架橋法、物理的吸着法、包括法等）で行うことができる。

#### 【0054】

本発明の酵素還元工程において、前記式(2)で表される化合物のホルミル基を立体選択的に還元する活性を有する酵素源としては、ブレタノマイセス (Bretanomyces) 属、キャンディダ (Candida) 属、クリプトコッカス (Cryptococcus) 属、デバリオマイセス (Debaryomyces) 属、ガラクトマイセス (Galactomyces) 属、オガタエア (Ogataea) 属、ピキア (Pichia) 属、ロドトルラ (Rhodotoru

la) 属、サッカロマイコプシス (Saccharomycopsis) 属、スポリディオボラス (Sporidiobolus) 属、スポロボロマイセス (Sporobolomyces) 属、ステリグマトマイセス (Sterigmatomyces) 属、トルラスポラ (Torulaspora) 属、トリコスポロン (Trichosporon) 属、ヤマダジーマ (Yamadazyma) 属、アクロモバクター (Achromobacter) 属、セルロモナス (Cellulomonas) 属、デボシア (Devosia) 属、ハフニア (Hafnia) 属、ジェンセニア (Jensenia) 属、クレブシエラ (Klebsiella) 属、プロテウス (Proteus) 属、ロドコッカス (Rhodococcus) 属、セラチア (Serratia) 属、シストフィロバシディウム (Cystofillobasidium) 属、ピキア (Pichia) 属、ロドトルラ (Rhodotorula) 属、トルラスポラ (Torulaspora) 属、ウィリオプシス (Williopsis) 属、ヤロビア (Yarrowia) 属、ミクロバクテリウム (Microbacterium) 属、又はミクロコッカス (Micrococcus) 属からなる群から選ばれた微生物由来の酵素源が挙げられる。

#### 【0055】

上記酵素源のうち、前記式(2)で表される化合物のホルミル基をR選択的に還元する活性を有する酵素源としては、ブレタノマイセス・アノマラス (Brettanomyces anomalus)、キャンディダ・カンタレリ (Candida cantarellii)、キャンディダ・グラエボーサ (Candida glabrata)、キャンディダ・グロペンギッセルイ (Candida glabrata)、キャンディダ・ラクチス・コンデンシイ (Candida lactis-condensii)、キャンディダ・マグノリエ (Candida magnoliae)、キャンディダ・マルトース (Candida maltosa)、キャンディダ・マリス (Candida maris)、キャンディダ・モギイ (Candida mogii)、キャンディダ・ピニ (Candida pini)、キャンディダ・ルゴース (Candida rugosa)、キャンディダ・ソルボフィラ (Candida sorbophila)、キャンディダ・トロピカリス (Candida tropicalis)、キャンディダ・バーサチリス (Candida versatilis)、クリプトコッカス・クルバタス (Cryptococcus curvatus)、クリプトコッカス・テレウス (Cryptococcus terreus)、デバリオマイセス・ネパレンシス (Debaryomyces nepalensis)、デバリオマイセス・ロベルトシエ (Debaryomyces robertsiae)、ガラクトマイセス・レースシイ (Galactomyces reessii)、オガタエア・ミヌータ バー. ミヌータ (Ogataea minuta var. minuta)、ピキア・カナデンシ

ス (Pichia canadensis)、ピキア・シルビコラ (Pichia silvicola)、ピキア・キシローサ (Pichia xylosa)、ロドトルラ・アウランチアカ (Rhodotorula aurantiaca)、ロドトルラ・グラミニス (Rhodotorula graminis)、ロドトルラ・ラクトーサ (Rhodotorula lactosa)、サッカロマイコプシス・セレノスポラ (Saccharomycopsis selenospora)、スポリディオボラス・ジョンソニー (Sporidiobolus johnsonii)、スポリディオボラス・サルモニコラ (Sporidiobolus salmonicolor)、スポロボロマイセス・サルモニコラ (Sporobolomyces salmonicolor)、ステリグマトマイセス・ハロフィラス (Sterigmatomyces halophilus)、トルラスポラ・デルブレッキイ (Torulaspora delbrueckii)、トリコスポロン・アステロイデス (Trichosporon asteroides)、ヤマダジーマ・スチピチス (Yamadazyma stipitis)、アクロモバクター・キシロキダンス サブスピーシーズ デニトリフィカンس (Achromobacter xylosoxidans subsp. denitrificans)、セルロモナス・フィミ (Cellulomonas fimi)、セルロモナス・スピーシーズ (Cellulomonas sp.)、セルロモナス・ウダ (Cellulomonas uda)、デボシア・リボフラビナ (Devosia riboflavina)、ハフニア・アルベイ (Hafnia alvei)、ジェンセニア・カニクルリア (Jensenia canicruria)、クレブシエラ・プランチコラ (Klebsiella planticola)、ミクロコッカス・ルテウス (Micrococcus luteus)、プロテウス・インコンスタンス (Proteus inconstans)、ロドコッカス・エリスロポリス (Rhodococcus erythropolis)、ロドコッカス・エクイ (Rhodococcus equi)、ロドコッカス・エスピー (Rhodococcus sp) 又はセラチア・マルセッセンス (Serratia marcescens) 等の微生物由来の酵素源が挙げられる。

#### 【0056】

また、前記式(2)で表される化合物のホルミル基をS選択的に還元する活性を有する酵素源としては、キャンディダ・マグノリエ (Candida magnoliae)、シストフィロバシディウム・ビスポリディ (Cystofillobasidium bisporidii)、ピキア・ビスポーラ (Pichia bispola)、ロドトルラ・グルチニス バー、グルチニス (Rhodotorula glutinis var. glutinis)、トルラスポラ・グロボーサ (Torulaspora globosa)、ウィリオプシス・サツルヌス バー、マラキイ

(Williopsis saturnus var. mrakii)、ウィリオブシス・サツルヌス バー、サツルヌス (Williopsis saturnus var. saturnus)、ヤロビア・リポリティカ (Yarrowia lipolytica)、デボシア・リボフラビナ (Devosia riboflavina)、ミクロバクテリウム・エステラロマチカム (Microbacterium esteraromaticum)、又はミクロコッカス・ルテウス (Micrococcus luteus) 等の微生物由来の酵素源が挙げられる。

#### 【0057】

また、上記微生物由来の還元酵素の産生能を有する微生物としては、野生株または変異株のいずれでもよい。あるいは細胞融合または遺伝子操作等の遺伝学的手法により誘導される微生物も用いることができる。遺伝子操作された本酵素を生産する微生物は、例えば、これらの酵素を単離及び／または精製して酵素のアミノ酸配列の一部または全部を決定する工程、このアミノ酸配列に基づいて酵素をコードするDNA配列を得る工程、このDNAを他の微生物に導入して組換え微生物を得る工程、及びこの組換え微生物を培養して、本酵素を得る工程を含有する方法により得ることができる (WO98/35025)。

#### 【0058】

酵素源として用いる微生物の為の培養培地は、その微生物が増殖し得るものである限り特に限定されない。例えば、炭素源として、グルコース、シュクロース等の糖質、エタノール、グリセロール等のアルコール類、オレイン酸、ステアリン酸等の脂肪酸及びそのエステル類、菜種油、大豆油等の油類、窒素源として、硫酸アンモニウム、硝酸ナトリウム、ペプトン、カザミノ酸、コーンステイープリカー、ふすま、酵母エキスなど、無機塩類として、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、炭酸カルシウム、リン酸1水素カリウム、リン酸2水素カリウムなど、他の栄養源として、麦芽エキス、肉エキス等を含有する通常の液体培地が使用することができる。培養は好氣的に行い、通常、培養時間は1～5日間程度、培地のpHが3～9、培養温度は10～50℃で行うことができる。

#### 【0059】

本発明の還元反応は、適当な溶媒中に基質の2-ホルミル酢酸エステル誘導体、補酵素NAD(P)H及び上記微生物の培養物またはその処理物等を添加し、

pH調整下攪拌することにより行うことができる。反応条件は用いる酵素、微生物またはその処理物、基質濃度等によって異なるが、通常、基質濃度は約0.1～100重量%、好ましくは1～60重量%であり、補酵素NAD(P)Hは基質に対して0.0001～100モル%、好ましくは0.0001～0.1モル%、反応温度は10～60℃、好ましくは20～50℃であり、反応のpHは4～9、好ましくは5～8であり、反応時間は1～120時間、好ましくは1～72時間で行うことができる。基質は一括、または連続的に添加して行うことができる。反応はバッチ方式または連続方式で行うことができる。

#### 【0060】

本発明の還元工程において、一般に用いられる補酵素NAD(P)H再生系を組み合わせる用いることにより、高価な補酵素の使用量を大幅に減少させることができる。代表的なNAD(P)H再生系としては、例えば、グルコース脱水素酵素及びグルコースを用いる方法が挙げられる。

#### 【0061】

還元酵素遺伝子及びこの酵素が依存する補酵素を再生する能力を有する酵素（例えばグルコース脱水素酵素）の遺伝子を同一宿主微生物内に導入した形質転換微生物の培養物またはその処理物等を用いて、上記と同様の反応を行えば、別途に補酵素の再生に必要な酵素源を調整する必要がないため、より低コストで光学活性3-ヒドロキシプロピオン酸エステル誘導体を製造することができる。

#### 【0062】

上記のような形質転換微生物としては、上記還元酵素をコードするDNA及び該酵素が依存する補酵素を再生する能力を有する酵素をコードするDNAを有するプラスミドで形質転換された形質転換微生物が挙げられる。ここで、酵素を再生する能力を有する酵素としては、グルコース脱水素酵素が好ましく、バシラス・メガテリウム (Bacillus megaterium) 由来のグルコース脱水素酵素がより好ましい。また、宿主微生物としては大腸菌 (Escherichia coli) が好ましい。

#### 【0063】

より好ましくは、キャンディダ・マグノリエ (Candida magnoliae) IFO 0705由来の還元酵素遺伝子及びバシラス・メガテリウム (Bacillus megater

ium) 由来のグルコース脱水素酵素遺伝子で形質転換された *Escherichia coli* HB101(pNTRCG) 受託番号 FERM BP-6898、デボシア・リボフラビナ (*Devosia riboflavina*) IFO13584 由来の還元酵素遺伝子及びバシラス・メガテリウム (*Bacillus megaterium*) 由来のグルコース脱水素酵素遺伝子で形質転換された *Escherichia coli* HB101(pNTRG1) 受託番号 FERM P-18872、ロドトルラ・グルチニス (*Rhodotorula glutinis*) IFO0415 由来の還元酵素遺伝子及びバシラス・メガテリウム (*Bacillus megaterium*) 由来のグルコース脱水素酵素遺伝子で形質転換された *Escherichia coli* HB101(pNTRGG1) 受託番号 FERM BP-7858、セラチア・マルセッセンス (*Serratia marcescens*) IFO12468 由来の還元酵素遺伝子及びバシラス・メガテリウム (*Bacillus megaterium*) 由来のグルコース脱水素酵素遺伝子で形質転換された *Escherichia coli* HB101(pNTSGG1) 受託番号 FERM P-18449、ミクロコッカス・ルテウス (*Micrococcus luteus*) IFO13867 由来の還元酵素遺伝子及びバシラス・メガテリウム (*Bacillus megaterium*) 由来のグルコース脱水素酵素遺伝子で形質転換された *Escherichia coli* HB101(pTSBG1) 受託番号 FERM BP-7119、又はロドコッカス・スピーシーズ (*Rhodococcus sp.*) KKK01 由来の還元酵素遺伝子で形質転換された *Escherichia coli* HB101(pNTRS) 受託番号 FERM P-18711 等が挙げられる。

#### 【0064】

なお、本発明の還元工程を、補酵素再生系と組み合わせて実施する、または、酵素源として上記形質転換微生物の培養物もしくはその処理物を用いる場合は、補酵素として、より安価な酸化型の NAD (P) を添加して反応を行うことも可能である。

#### 【0065】

還元反応で生じた光学活性 3-ヒドロキシプロピオン酸エステル誘導体は、常法により精製することが出来る。例えば、光学活性 2-(ヒドロキシメチル)-3-フェニルプロピオン酸エチルは、微生物等を用いた場合には必要に応じ遠心分離、濾過等の処理を施して菌体等の懸濁物を除去し、次いで酢酸エチル、トルエン等の有機溶媒で抽出し、有機溶媒を減圧下に除去し、そして減圧蒸留または

クロマトグラフィー等の処理を行う事により、精製することができる。

### 【0066】

#### 【実施例】

以下に実施例を挙げ、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

### 【0067】

#### (参考例1) 3-(3, 4-メチレンジオキシフェニル)-プロピオン酸エチルエステルの調製

3, 4-メチレンジオキシケイ皮酸 50 g をエタノール 500 ml に溶解させ、これに 5% Pd/C 触媒 5 g を加えた。反応系を水素ガス置換し、25℃で6時間攪拌した。反応終了後、Pd/C 触媒をろ過操作にて除去した。得られたエタノール溶液を 5℃に冷却し、塩化チオニル 37.1 g を一時間かけて滴下した。滴下終了後、内温 5℃でさらに3時間攪拌した。反応終了後、減圧下にて溶媒を留去し、橙色濃縮物 54.7 g を得た。これを一部抜き取り、HPLC (カラム: Lichrosphere, 移動相: リン酸・リン酸二水素カリウム水溶液/アセトニトリル=1/1, 流速: 1 mL/min., 検出波長: 210 nm, カラム温度: 30℃) にて分析を行ったところ、表題化合物 49.8 g を含有していることを確認した。

$^1\text{H}$  NMR (400 Hz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 6.77-6.63 (3H, m), 5.93 (2H, s), 4.17-4.10 (2H, q), 2.86 (2H, t), 2.56 (2H, t), 1.27 (3H, t)。

### 【0068】

#### (実施例1) 2-ホルミル-3-(3, 4-メチレンジオキシフェニル)-プロピオン酸エチルの製造法

60% NaH 42.4 g をテトラヒドロフラン (THF) 500 ml に懸濁した。3-(3, 4-メチレンジオキシフェニル)-プロピオン酸エチル 84.5 g (純度 93.7 wt%) を THF 100 ml に溶かし、先の懸濁液に室温で滴下した。40℃に昇温して15分攪拌した後、蟻酸エチル 131 g を 2.5 時間



かけて滴下した後、さらに3時間攪拌した。溶媒を留去し、反応溶液を約半量まで濃縮した後、氷浴で冷却し、水500mlを内温が10℃以下を保つ速度で滴下した。水層をヘキサン200mlで二回洗浄した後に、濃塩酸でpH4.5に調節した。トルエン500mlで3回抽出し、減圧濃縮により表題化合物82.8gを得た。下記の条件にてガスクロマトグラフィー(GC)法にて化学純度を分析したところ、化学純度94.7wt%であった。

GC分析条件=カラム:TC-FFAP 1m×0.25mm I.D. (GLサイエンス社製)、キャリアーガス:He=8kPa、検出:FID、カラム温度:150℃、検出時間:2-ホルミル-3-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-プロピオン酸エチル 4.0分、2-(ヒドロキシメチル)-3-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-プロピオン酸エチル 12.1分。

#### 【0069】

##### (実施例2) 2-ホルミル-3-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-プロピオン酸エチルの製造法

60%NaH 7.91gをTHF 12mlに懸濁し、40℃に昇温した。3-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-プロピオン酸エチル 11.0gと蟻酸エチル 11.0gをTHF 77.0gに溶解し、先の懸濁液に5~14時間掛けて滴下した。1時間攪拌後、蟻酸エチル 3.7gを5時間で添加し、更に12時間攪拌した。得られた反応混合物にトルエン 250mlを加えて減圧濃縮し、約10重量%のトルエン懸濁液とした後、これを10℃以下に冷却した水 55mlに内温が維持できる速度で滴下した。有機層を廃棄後、水層をトルエン 180mlで一回洗浄し、この混合物を濃塩酸でpH5~7に調節した後に、トルエン 90mlで2回抽出し、1回水洗後、有機相を減圧濃縮して、表題化合物 11.2gを得た。実施例1の方法に従い、化学純度を分析したところ、化学純度98.8wt%であった。

#### 【0070】

##### (実施例3) 2-ホルミル-3-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-プロピオン酸メチルの製造法

60%NaH 1.38gをTHF 12mlに懸濁した。3-(3,4-メチレ

ンジオキシフェニル) -プロピオン酸メチル 2.4 g を THF 12 ml に溶かし、先の懸濁液に室温で滴下した。40℃に昇温して15分攪拌した後、蟻酸メチル 3.46 g を1時間かけて滴下した。さらに、60% NaH 0.7 g 及蟻酸メチル 0.9 g を4回に分割して添加した後、40℃にて3時間攪拌した。溶媒を留去し、反応溶液を約半量まで濃縮した後、氷浴で冷却し、水 40 ml を内温が10℃以下を保つ速度で滴下した。水層をトルエン 50 ml で二回洗浄した後に、濃塩酸で pH 4.5 に調節した。トルエン 50 ml で2回抽出し、減圧濃縮により表題化合物 2.63 g を得た。実施例1の方法に従い、化学純度を分析したところ、化学純度 96.4 wt % であった。

## 【0071】

(実施例4) 2-ホルミルヘキサン酸エチルの製造法

60% NaH 60 g を THF 600 ml に懸濁し、ヘキサン酸エチル 72.1 g を先の懸濁液に室温で滴下した。40℃に昇温して15分攪拌した後、蟻酸エチル 185.2 g を6時間かけて滴下した。さらに、60% NaH 30 g 及蟻酸エチル 92.6 g を4回に分割して添加した後、40℃にて3時間攪拌した。溶媒を留去し、反応溶液を約半量まで濃縮した後、氷浴で冷却し、水 40 ml を内温が10℃以下を保つ速度で滴下した。水層をトルエン 400 ml で二回洗浄した後に、濃塩酸で pH 4.5 に調節した。トルエン 700 ml で2回抽出し、減圧濃縮により表題化合物 76.8 g を得た。下記の方法に従い、化学純度を分析したところ、化学純度 96.6 wt % であった。

GC分析条件=カラム: HP-5 30m×0.32mm I.D. (J&W Scientific社製)、キャリアーガス: He=125 kPa、検出: FID、カラム温度: 120℃、検出時間: 2-ホルミルヘキサン酸エチル 6.9分、2-ヒドロキシメチルヘキサン酸エチル 9.8分。

$^1\text{H}$  NMR (400 Hz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 11.42 (0.6 H, d), 9.70 (0.4 H, d), 7.0 (0.6 H, d), 4.16-4.27 (2 H, m), 3.25 (0.4 H, m), 1.24-2.37 (9 H, m), 0.90 (3 H, t)。

## 【0072】

(実施例 5) 2-ホルミルヘキサン酸エチルの製造法

60% NaH 62 g を THF 126 ml に懸濁し、40℃に昇温した。ヘキサン酸エチル 56 g と蟻酸エチル 86 g を THF 250 ml に溶解し、先の懸濁液に 5～20 時間掛けて滴下した。3 時間攪拌後、蟻酸エチル 86 g を 5 時間で添加し、更に 12 時間攪拌した。得られた反応混合物にトルエン 1200 ml を加えて減圧濃縮し、約 10 重量%のトルエン懸濁液とした後、これを 10℃以下に冷却した水 280 ml に内温が維持できる速度で滴下した。有機層を廃棄後、水層をトルエン 570 ml で一回洗浄し、この混合物を濃塩酸で pH 5～7 に調節した後に、酢酸エチル 280 ml で 2 回抽出し、1 回水洗後、有機相を減圧濃縮して、表題化合物 55 g を得た。実施例 4 の方法に従い、化学純度を分析したところ、化学純度 97.2 wt % であった。

【0073】

(実施例 6) 2-ホルミル酪酸エチルの製造法

酪酸エチルを用いて、実施例 4 と同様の方法に従い、表題化合物を茶色油状物として得た。実施例 4 の方法に従い、化学純度を分析したところ、化学純度 96.4 wt % であった。

$^1\text{H}$  NMR (400 Hz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 11.42 (0.6 H, d), 9.70 (0.4 H, d), 7.0 (0.6 H, d), 4.15–4.28 (2 H, m), 3.17–3.21 (0.4 H, m), 1.23–2.29 (5 H, m), 0.96–1.05 (3 H, m)。

【0074】

(実施例 7) 2-ホルミルヘプタン酸エチルの製造法

ヘプタン酸エチルを用いて、実施例 4 と同様の方法に従い、表題化合物を茶色油状物として得た。実施例 4 の方法に従い、化学純度を分析したところ、化学純度 96.7 wt % であった。

$^1\text{H}$  NMR (400 Hz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 11.43 (0.6 H, d), 9.70 (0.4 H, d), 7.1 (0.6 H, d), 4.16–4.27 (2 H, m), 3.23–3.27 (0.4 H, m), 1.21–2.06 (11 H, m), 0.85–0.91 (3 H, m)。

## 【0075】

(実施例 8) 2-ホルミルオクタン酸エチルの製造法

オクタン酸エチルを用いて、実施例 4 と同様の方法に従い、表題化合物を茶色油状物として得た。実施例 4 の方法に従い、化学純度を分析したところ、化学純度 95.4 wt % であった。

$^1\text{H}$  NMR (400 Hz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 11.43 (0.6 H, d), 9.70 (0.4 H, d), 7.0 (0.6 H, d), 4.16–4.27 (2 H, m), 3.23–3.27 (0.4 H, m), 1.25–1.88 (13 H, m), 0.88 (3 H, t)。

## 【0076】

(比較例 1) 2-ホルミル-3-フェニルプロピオン酸エチルの製造法

60% NaH 4.4 g を THF 200 ml に懸濁した溶液に、3-フェニルプロピオン酸エチル 17.8 g 及び蟻酸エチル 8.2 g を氷冷下、1 時間かけて滴下した後、室温にて 15 時間攪拌した。さらに、60% NaH 14 g 及び蟻酸エチル 25.9 g を 3 回に分割して添加した後、室温にて 15 時間攪拌した。得られた反応液に、10% クエン酸溶液を添加した後、酢酸エチルにて抽出し、減圧濃縮することにより茶色油状の濃縮物 32.4 g を得た。得られた濃縮物をシリカゲルカラムにて精製することにより、表題化合物 17.9 g を透明油状物として得た。

## 【0077】

(比較例 2) 2-ホルミル-3-フェニルプロピオン酸メチルの製造法

3-フェニルプロピオン酸メチル及び蟻酸メチルを用いて、比較例 1 と同様の方法に従い、表題化合物を透明油状物として得た。

## 【0078】

(比較例 3) 2-ホルミル-3-フェニルプロピオン酸イソプロピルの製造法

3-フェニルプロピオン酸イソプロピル及び蟻酸イソプロピルを用いて、比較例 1 と同様の方法に従い、表題化合物を透明油状物として得た。

## 【0079】

(比較例 4) 2-ホルミル-3-フェニルプロピオン酸イソブチルの製造法

3-フェニルプロピオン酸イソブチル及び蟻酸イソブチルを用いて、比較例 1 と同様の方法に従い、表題化合物を透明油状物として得た。

【0080】

(比較例 5) 2-ホルミル-3-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-プロピオン酸エチルの製造法

60% NaH 2.0 g を THF 30 ml に懸濁した。懸濁液を 0℃ に冷却し、3-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-プロピオン酸エチル 6.0 g (純度 92.1 wt%) を THF 20 ml に溶かし、先の懸濁液に滴下した。0℃ で蟻酸エチル 4 mL を滴下した後、室温に戻しさらに 20 分攪拌した。反応溶液を 40℃ に加熱し、さらに攪拌を続けた。加熱後、約 30 分でガス発生が認められた。ガス発生が終わった時点で HPLC (カラム: Lichrosphere, 移動相: リン酸・リン酸二水素カリウム水溶液/アセトニトリル = 1/1, 流速: 1 mL/min., 検出波長: 210 nm, カラム温度: 30℃) にて反応溶液を分析したところ、原料の残存が認められたため、さらに NaH 1 g, 蟻酸エチル 4 mL を加え、40℃ で攪拌した。再びガス発生が始まり、15 分程度で終了した。反応液を再度分析したところ、まだ原料の残存が認められたため、再度 NaH 1 g と蟻酸エチル 4 mL を加えた。ガス発生終了後、再度分析を行ったところ、わずかに原料の残存があり、さらに NaH 1 g および蟻酸エチル 8 mL を添加、原料の消失を確認したので、反応を停止した。塩酸で pH = 7~8 に調整後、酢酸エチルを加え抽出を行った。分液ロートにて、NaH に含まれるミネラルオイルを分液操作で除去し、得られた酢酸エチル層を濃縮することにより、オレンジ色のオイルとして表題化合物 4.75 g を得た。実施例 1 の方法に従い、化学純度を分析したところ、化学純度 80.20 wt% であった。

【0081】

(実施例 9) 光学活性 2-(ヒドロキシメチル)-3-フェニルプロピオン酸エチルの製造法

グルコース 4%, イーストエキス 0.3%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.3%,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  0.7%, NaCl 0.01%,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.08%, Zn

$\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.006%、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.009%、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.0005%、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \sim 5\text{H}_2\text{O}$  0.001%からなる液体培地 (pH 7.0) を調製し、大型試験管に5mlずつ分注して、120℃で20分間蒸気殺菌した。これらの液体培地に表1に示した微生物をそれぞれ1白金耳植菌し、30℃で2～3日間振盪培養した。この培養液から遠心分離により菌体を集め、水洗後、0.1Mリン酸緩衝液 (pH 6.5) 1mlに懸濁した。この菌体懸濁液0.5mlと、2-ホルミル-3-フェニルプロピオン酸エチル 2mg、グルコース 20mgを含有する0.1Mリン酸緩衝液0.5mlとを混合し、栓付試験管に入れ30℃で24時間振盪した。反応後、反応液を等量体積の酢酸エチルにより抽出し、抽出液中の基質及び生成物量をガスクロマトグラフィー (GC) 法により分析することにより、変換率 (%) を求めた。また、光学純度については、生成物をTLCにて精製した後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法により分析した。その結果を表1に示す (変換率は20～100%)。

#### 【0082】

分析条件、及び、変換率、光学純度の計算方法は以下の通りである。

GC分析条件=カラム: TC-FFAP 5m×0.25mm I.D. (GLサイエンス社製)、キャリアーガス: He=30kPa、検出: FID、カラム温度: 150℃、検出時間: 2-ホルミル-3-フェニルプロピオン酸エチル 4.0分、2-ヒドロキシメチル-3-フェニルプロピオン酸エチル 12.0分。

HPLC分析条件=カラム: Chiralcel AS (ダイセル化学工業株式会社製)、溶離液: ヘキサン/イソプロパノール=98/2、流速: 1.0ml/min、検出: 210nm、カラム温度: 40℃、検出時間: R体16.1分、S体18.3分。

変換率 (%) = 生成物量 / (基質量 + 生成物量) × 100

光学純度 (% ee) = (A - B) / (A + B) × 100 (A及びBは対応する鏡像異性体量を表わし、A > Bである)。

#### 【0083】

【表 1】

微生物		光学純度 %e. e.	立体配置
<i>Brettanomyces anomalus</i>	IFO 0627	86.8	(R)
<i>Candida cantarellii</i>	IFO 1261	53.1	(R)
<i>Candida glabrosa</i>	IFO 1353	6.0	(R)
<i>Candida gropengiesseri</i>	IFO 0659	77.8	(R)
<i>Candida lactis-condensi</i>	IFO 1286	87.1	(R)
<i>Candida magnoliae</i>	IFO 0705	65.5	(R)
<i>Candida maltosa</i>	IFO 1977	70.3	(R)
<i>Candida maris</i>	IFO 10003	75.2	(R)
<i>Candida mogii</i>	IFO 0436	43.8	(R)
<i>Candida pini</i>	IFO 1327	53.1	(R)
<i>Candida rugosa</i>	IFO 0591	64.6	(R)
<i>Candida sorbophila</i>	IFO 1583	90.1	(R)
<i>Candida tropicalis</i>	IFO 1403	78.5	(R)
<i>Candida versatilis</i>	IFO 1228	88.1	(R)
<i>Cryptococcus curvatus</i>	IFO 1159	17.6	(R)
<i>Cryptococcus terreus</i>	IFO 0727	37.3	(R)
<i>Debaryomyces nepalensis</i>	IFO 0039	72.0	(R)
<i>Debaryomyces robertsiae</i>	IFO 1277	60.8	(R)
<i>Galactomyces reessii</i>	IFO 10823	72.2	(R)
<i>Ogataea minuta</i> var. <i>minuta</i>	IFO 0975	78.1	(R)
<i>Pichia canadensis</i>	IFO 0976	68.7	(R)
<i>Pichia canadensis</i>	IFO 0973	77.4	(R)
<i>Pichia silvicola</i>	IFO 0807	37.4	(R)
<i>Pichia xylosa</i>	IFO 0950	43.9	(R)
<i>Rhodotorula aurantiaca</i>	IFO 0754	4.5	(R)
<i>Rhodotorula graminis</i>	IFO 0190	32.5	(R)
<i>Rhodotorula lactosa</i>	IFO 1423	16.5	(R)
<i>Saccharomycopsis selenospora</i>	IFO 1850	54.8	(R)
<i>Sporidiobolus johnsonii</i>	IFO 6903	40.0	(R)
<i>Sporidiobolus salmonicolor</i>	IFO 1035	6.0	(R)
<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>	IFO 1038	4.8	(R)
<i>Sterigmatomyces halophilus</i>	IFO 1488	23.6	(R)
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	IFO 0381	90.6	(R)
<i>Trichosporon asteroides</i>	IFO 0173	47.7	(R)
<i>Yamadazyma stipitis</i>	IFO 10063	17.0	(R)
<i>Cystofillobasidium bisporidii</i>	IFO 1927	24.8	(S)
<i>Pichia bispola</i>	IFO 0803	13.3	(S)
<i>Rhodotorula glutinis</i> var. <i>glutinis</i>	IFO 0697	43.7	(S)
<i>Torulaspora globosa</i>	IFO 0016	76.5	(S)
<i>Williopsis saturnus</i> var. <i>mrakii</i>	IFO 0895	9.3	(S)
<i>Williopsis saturnus</i> var. <i>saturnus</i>	IFO 0992	10.8	(S)
<i>Yarrowia lipolytica</i>	IFO 0746	4.4	(S)

【0084】

(実施例 10) 光学活性 2-(ヒドロキシメチル)-3-フェニルプロピオン  
酸エチルの製造法

表 2 に示す微生物について、グリセリン 1.5%、イーストエキス 0.5%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.3%、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  0.7%、 $\text{NaCl}$  0.01%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.08%、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.006%、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.009%、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.0005%、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \sim 5\text{H}_2\text{O}$  0.001% からなる液体培地 (pH 7.0) を用いて培養する以外は、実施例 9 と同様の方法に従い、変換率及び光学純度を測定した。その結果を表 2 に示す (変換率は 20~100%)。

【0085】

【表 2】

微生物		光学純度 %e. e.	立体配置
<i>Achromobacter xylosoxidans subsp. denitrificans</i>	IFO 15125	83.4	(R)
<i>Cellulomonas fimi</i>	IFO 15513	63.6	(R)
<i>Cellulomonas sp.</i>	JCM 2471	65.4	(R)
<i>Cellulomonas uda</i>	IFO 3747	19.3	(R)
<i>Hafnia alvei</i>	IFO 3731	85.6	(R)
<i>Jensenia canicruria</i>	IFO 13914	74.2	(R)
<i>Klebsiella planticola</i>	IFO 3317	80.1	(R)
<i>Proteus inconstans</i>	IFO 12931	81.6	(R)
<i>Rhodococcus erythropolis</i>	IFO 12320	75.8	(R)
<i>Rhodococcus equi</i>	IFO 3730	88.5	(R)
<i>Microbacterium esteraromaticum</i>	IFO 3752	25.5	(S)

【0086】

(実施例 11) 光学活性 2-(ヒドロキシメチル)-3-フェニルプロピオン  
酸エチルの製造法

グルコース 4%、イーストエキス 0.3%、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.3%、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  0.7%、 $\text{NaCl}$  0.01%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.08%、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.006%、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.009%、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.0005%、 $\text{MnSO}_4 \cdot 4 \sim 5\text{H}_2\text{O}$  0.001% からなる液体培地 (pH 7.0) を調製し、大型試験管に 5ml ずつ分注して、120℃で 20



分間蒸気殺菌した。これらの液体培地に表3に示した微生物をそれぞれ1白金耳植菌し、30℃で2～3日間振盪培養した。この培養液から遠心分離により菌体を集め、水洗し、氷冷アセトンを追加した後、減圧乾燥することにより、アセトン乾燥菌体を調製した。得られたアセトン乾燥菌体5mg、2-ホルミル-3-フェニルプロピオン酸エチル2mg、グルコース10mg、NAD（またはNADP）1mg、0.1Mリン酸緩衝液0.5ml（pH=6.5）及び酢酸エチル0.5mlを栓付試験管に添加し、30℃で24時間振盪した。次に、実施例9と同様の操作を行い、変換率及び光学純度を測定した。その結果を表3に示す。

【0087】

【表3】

微生物		NAD		NADP	
		変換率 %	光学純度 % e.e.	変換率 %	光学純度 % e.e.
<i>Candida magnoliae</i>	IFO 0705	<2	—	10.0	35.3
<i>Candida maris</i>	IFO 10003	<2	—	4.1	97.4
<i>Candida sorbophila</i>	IFO 1583	<2	—	44.2	31.8
<i>Candida tropicalis</i>	IFO 1403	<2	—	18.0	38.5
<i>Candida versatilis</i>	IFO 1228	<2	—	3.2	23.5
<i>Ogataea minuta</i> var. <i>minuta</i>	IFO 0975	<2	—	52.6	99.1
<i>Pichia canadensis</i>	IFO 0976	<2	—	53.6	98.0
<i>Pichia canadensis</i>	IFO 0973	<2	—	72.3	96.4
<i>Pichia silvicola</i>	IFO 0807	<2	—	11.6	83.1
<i>Saccharomycopsis selenospora</i>	IFO 1850	<2	—	9.7	33.6
<i>Torulaspora globosa</i>	IFO 0016	55.1	82.5	49.6	53.8

【0088】

（実施例12） 光学活性2-ヒドロキシメチルアルカン酸エチルの製造法

実施例11で得られたアセトン乾燥菌体5mg、各種2-ホルミルアルカン酸エチル2mg、グルコース10mg、NADP 1mg、0.1Mリン酸緩衝液0.5ml（pH=6.5）及び酢酸エチル0.5mlを栓付試験管に添加し、30℃で24時間振盪した。反応後、反応液を等量体積の酢酸エチルにより抽出し、抽出液中の基質及び生成物量をガスクロマトグラフィー（GC）法により分析することにより、変換率（%）を求めた。また、光学純度については、生成物を

HPLCラベル化剤(3, 5-ジニトロ塩化ベンゾイル)を用いて誘導化し、TLCにて精製した後、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)法により分析した。その結果を表4に示す。分析条件は以下の通りである。

GC分析条件=カラム: HP-5 30m×0.32mm I.D. (J&W Scientific社製)、キャリアーガス: He=125kPa、検出: FID、カラム温度: 120℃、検出時間: 2-ホルミルヘキサン酸エチル 6.9分、2-ヒドロキシメチルヘキサン酸エチル 9.8分。

HPLC分析条件=カラム: Chiralcel OD-H (ダイセル化学工業株式会社製)、溶離液: ヘキサン/イソプロパノール=95/5、流速: 0.5ml/min、検出: 210nm、カラム温度: 40℃、検出時間: (R)-2-ヒドロキシメチルヘキサン酸エチル誘導体 30.6分、(S)-2-ヒドロキシメチルヘキサン酸エチル誘導体 37.4分。

【0089】

【表4】

微生物	基質	変換率 %	光学純度 % e.e.
<i>Ogataea minuta</i> var. <i>minuta</i> IFO 0975	2-ホルミル酪酸エチル	90	88.7
	2-ホルミルヘキサン酸エチル	45	96.7
	2-ホルミルオクタン酸エチル	41	75.0
<i>Pachysolen tannophilus</i> IFO 1007	2-ホルミル酪酸エチル	63	37.5
	2-ホルミルヘキサン酸エチル	35	74.6
	2-ホルミルオクタン酸エチル	63	87.0
<i>Pichia angusta</i> IAM 12898	2-ホルミル酪酸エチル	89	48.1
	2-ホルミルヘキサン酸エチル	55	91.5
	2-ホルミルオクタン酸エチル	61	71.0

【0090】

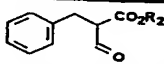
(実施例13) 光学活性2-(ヒドロキシメチル)-3-フェニルプロピオン酸エステルの製造法

組換え大腸菌HB101 (pNTCRG) 受託番号FERM BP-6898を、500ml容坂口フラスコ中で滅菌した50mlの2×YT培地(トリペプトン 1.6%、イーストエキス 1.0%、NaCl 0.5%、pH=7.0)に接種し、37℃で18時間振とう培養した。得られた培養液1mlに表5に示す各種2-ホルミル-3-フェニルプロピオン酸エステル10mg、NADP

1 mg、グルコース 10 mg を添加し、30℃で2時間攪拌した。反応終了後、実施例 9 と同様の分析法で、変換率及び光学純度を分析した。その結果を表 5 に示す（いずれも変換率は 100%であった）。

【0091】

【表 5】

基質 	光学純度 % e.e.	立体配置
R <sub>2</sub> = Methyl	93	(R)
Ethyl	89	(R)
iso-Propyl	6	(S)
iso-Butyl	72	(R)

【0092】

（実施例 14） 光学活性 2-（ヒドロキシメチル）-3-（3,4-メチレンジオキシフェニル）-プロピオン酸エチルの製造法

表 6 に示す各種組み換え大腸菌を、500 ml 容坂口フラスコ中で滅菌した 50 ml の 2×YT 培地（トリペプトン 1.6%、イーストエキス 1.0%、NaCl 0.5%、pH=7.0）に接種し、37℃で18時間振とう培養した。得られた培養液 1 ml に 2-ホルミル-3-（3,4-メチレンジオキシフェニル）-プロピオン酸エチル 10 mg、NAD（または NADP）1 mg、グルコース 10 mg を添加し、30℃で2時間攪拌した。反応終了後、実施例 9 と同様の分析法で、変換率と生成物の光学純度を分析した。その結果を表 6 に示す（いずれも変換率は 100%であった）。

【0093】

【表 6】

微生物	光学純度 % e.e.	立体配置 %
<i>E. coli</i> HB101(pNTCRG)	95.7	(R)
<i>E. coli</i> HB101(pNTDRG1)	12.5	(R)
<i>E. coli</i> HB101(pNTRGG1)	78.3	(R)
<i>E. coli</i> HB101(pNTSGG1)	61.3	(R)
<i>E. coli</i> HB101(pTSBG1)	42.9	(S)

## 【0094】

## (実施例15) 光学活性2-ヒドロキシメチルアルカン酸エチルの製造法

表7に示す各種組み換え大腸菌を、500ml容坂口フラスコ中で滅菌した50mlの2×YT培地（トリペプトン 1.6%、イーストエキス 1.0%、NaCl 0.5%、pH=7.0）に接種し、37℃で18時間振とう培養した。得られた培養液1mlに2-ホルミルアルカン酸エチル10mg、NAD（またはNADP）1mg、グルコース10mgを添加し、30℃で2時間攪拌した。反応終了後、実施例12と同様の分析法で、変換率と生成物の光学純度を分析した。その結果を表7に示す（いずれも変換率は100%であった）。

## 【0095】

【表7】

微生物	基質	変換率 %	光学純度 % e.e.	立体配置
<i>E. coli</i> HB101(pNTCRG) FERM BP-6898	2-ホルミル酪酸エチル	100	71.9	(S)
	2-ホルミルヘキサン酸エチル	100	15.4	(S)
	2-ホルミルオクタン酸エチル	100	59.2	(R)
<i>E. coli</i> HB101(pNTDRG1) FERM P-18872	2-ホルミル酪酸エチル	100	94.2	(S)
	2-ホルミルヘキサン酸エチル	91	8.8	(R)
	2-ホルミルオクタン酸エチル	93	0.4	(S)
<i>E. coli</i> HB101(pNTRGG1) FERM BP-7858	2-ホルミル酪酸エチル	12.5		
	2-ホルミルヘキサン酸エチル	30	94.6	(R)
	2-ホルミルオクタン酸エチル	99	65.4	(R)
<i>E. coli</i> HB101(pTSBG1) FERM BP-7119	2-ホルミル酪酸エチル	77	62.8	(R)
	2-ホルミルヘキサン酸エチル	63	77.0	(R)
	2-ホルミルオクタン酸エチル	52	41.9	(R)

## 【0096】

## (実施例16) (R)-2-(ヒドロキシメチル)-3-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-プロピオン酸エチルの製造法

組換え大腸菌HB101(pNTCRG) 受託番号FERM BP-6898を、500ml容坂口フラスコ中で滅菌した50mlの2×YT培地（トリペプトン 1.6%、イーストエキス 1.0%、NaCl 0.5%、pH=7.0）に接種し、37℃で18時間振とう培養した。得られた培養液550mlに実施例5で得られた3-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-2-ホルミル

プロピオン酸エチル 87 g、NADP 27.5 mg、グルコース 89 g を添加し、30℃で24時間攪拌した。反応終了後、反応液からトルエンを用いて抽出、濃縮することにより、茶色油状物 84.1 g を得た。実施例9と同様の分析法で、生成物の化学純度と光学純度を分析したところ、化学純度 96.5%、光学純度 96.4% ee、(R) 体であった。

$^1\text{H}$  NMR (400 Hz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 6.73–6.56 (3H, m), 5.93 (2H, s), 4.12–4.23 (2H, q), 3.76–3.64 (2H, m), 2.95–2.69 (3H, m), 1.27 (3H, t)。

#### 【0097】

(実施例17) (R)-2-(ヒドロキシメチル)-3-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-プロピオン酸メチルの製造法

組換え大腸菌 HB101 (pNTCRG) 受託番号 FERM BP-6898 を、500 ml 容坂口フラスコ中で滅菌した 50 ml の 2×YT 培地 (トリペプトン 1.6%、イーストエキス 1.0%、NaCl 0.5%、pH=7.0) に接種し、37℃で18時間振とう培養した。得られた培養液 50 ml に実施例1で得られた 2-ホルミル-3-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-プロピオン酸エチル 1.89 g、NADP 2.5 mg、グルコース 1.9 g を添加し、30℃で24時間攪拌した。反応終了後、反応液からトルエンを用いて抽出、濃縮することにより、茶色油状物 1.82 g を得た。実施例9と同様の分析法で、生成物の化学純度及び光学純度を分析したところ、化学純度 96.8%、光学純度 98.0% ee、(R) 体であった。

$^1\text{H}$  NMR (400 Hz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 6.73–6.62 (3H, m), 5.93 (2H, s), 3.77–3.67 (2H, m), 3.70 (3H, s), 2.96–2.90 (1H, m), 2.82–2.75 (2H, m)。

#### 【0098】

(実施例18) (S)-2-(3,4-メチレンジオキシベンジル)-3-ヒドロキシプロピオン酸エチルの製造法

組換え大腸菌 HB101 (pTSBG1) 受託番号 FERM BP-7119 を、500 ml 容坂口フラスコ中で滅菌した 50 ml の 2×YT 培地 (トリペプ

トン 1.6%、イーストエキス 1.0%、NaCl 0.5%、pH=7.0) に接種し、37℃で18時間振とう培養した。得られた培養液50mlに実施例5で得られた2-ホルミル-3-(3,4-メチレンジオキシフェニル)-プロピオン酸エチル0.5g、NADP 2.5mg、グルコース0.5gを添加し、30℃で24時間攪拌した。反応終了後、反応液からトルエンを用いて抽出、濃縮することにより、茶色油状物0.49gを得た。実施例9と同様の分析法で、生成物の化学純度と光学純度を分析したところ、化学純度96.8%、光学純度43% ee、(S)体であった。

$^1\text{H}$  NMR (400Hz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 6.73-6.56 (3H, m), 5.93 (2H, s), 4.12-4.23 (2H, q), 3.76-3.64 (2H, m), 2.95-2.69 (3H, m), 1.27 (3H, t)。

#### 【0099】

##### (実施例19) (R)-2-ヒドロキシメチルヘキサン酸エチルの合成

組換え大腸菌HB101 (pNTRS) 受託番号FERM P-18711を、500ml容坂口フラスコ中で滅菌した50mlの2×YT培地 (トリペプトン 1.6%、イーストエキス 1.0%、NaCl 0.5%、硫酸亜鉛7水和物 50mg、pH=7.0) に接種し、30℃で40時間振とう培養した。得られた培養液25mlにグルコース脱水素酵素 (天野エンザイム社製) 1,000 units、2-ホルミルヘキサン酸エチル2.5g、NAD<sup>+</sup>3mg、グルコース4g、硫酸亜鉛7水和物50mgを添加し、2.5Mの水酸化ナトリウム水溶液を滴下することによりpH6.5に調整しながら、30℃で24時間攪拌した。反応終了後、反応液に酢酸エチル100mlを加えて抽出し、有機相を減圧下で留去後、シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより精製し、油状の(R)-2-ヒドロキシメチルヘキサン酸エチルを得た。収率は90%、光学純度は93.6% ee. であった。なお、光学純度の分析は、HPLCラベル化剤 (3,5-ジニトロ塩化ベンゾイル) を用いて誘導化した後、Chiralcel OD-Hカラム (ダイセル化学工業社製、0.46x25cm) を用いたHPLC法によって行なった。

$^1\text{H}$  NMR (400Hz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 4.13-4.24 (2H, q)

, 3.72-3.79 (2H, m), 2.53-2.59 (1H, m), 1.5-1.7 (2H, m), 1.24-1.37 (7H, m), 0.9 (3H, t)。

【0100】

(実施例 20) (R)-2-ヒドロキシメチルヘプタン酸エチルの合成

2-ホルミルヘプタン酸エチルを用いて、実施例 19 と同様の方法に従い、表題化合物を透明油状物として得た。収率は 90%、光学純度は 87% ee であった。

$^1\text{H}$  NMR (400 Hz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$ : 4.13-4.24 (2H, q), 3.69-3.79 (2H, m), 2.53-2.59 (1H, m), 1.44-1.69 (2H, m), 1.22-1.36 (9H, m), 0.9 (3H, t)。

【0101】

【発明の効果】

本発明の方法により、医薬品中間体として有用な光学活性 3-ヒドロキシプロピオン酸エステル誘導体を安価な原料から簡便に製造することができる。

【書類名】

要約書

【要約】

【課題】 医薬品中間体として有用な光学活性 3-ヒドロキシプロピオン酸エステル誘導体を安価な原料から簡便に製造できる方法を提供する。

【解決手段】 安価に入手可能な酢酸エステル誘導体と塩基及び蟻酸エステルとを反応させて、2-ホルミル酢酸エステル誘導体に変換した後、前記化合物のホルミル基を立体選択的に還元する能力を有する酵素源を用いて、前記化合物のホルミル基を立体選択的に還元することにより、光学活性 3-ヒドロキシプロピオン酸エステル誘導体を製造する。

【選択図】 なし。



出願人履歴情報

識別番号

[000000941]

1. 変更年月日

1990年 8月27日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号

氏 名

鐘淵化学工業株式会社